

## 유기용매 이상계에서의 Thermolysin에 의한 아스파탐 전구체 생산

이인영 · 안경섭 · 이선복<sup>1\*</sup>

한국과학기술연구원 유전공학연구소 효소공학연구실, <sup>1</sup>포항공과대학 화학공학과

### Synthesis of an Aspartame Precursor Using Thermolysin in Organic Two-Phase System

Lee, In-Young, Kyung-Seop Ahn and Sun-Bok Lee<sup>1\*</sup>

Enzyme Technology Lab., Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon 305-606, Korea

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Pohang Institute of Science and Technology, Pohang 790-600, Korea

**Abstract** — The synthesis of N-benzyloxycarbonyl-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester(Z-APM), a precursor of aspartame, from N-benzyloxycarbonyl-L-aspartic acid(Z-Asp) and L-phenylalanine methyl ester hydrochloride(L-PM·HCl) was investigated in ethylacetate-MES buffer two-phase system using thermolysin. In organic two-phase system, the degree of spontaneous hydrolysis of L-PM·HCl was significantly reduced with increasing the volume ratio of organic to aqueous phase. Stability of thermolysin in organic two-phase system was found to be higher than that in MES buffer solution. More than 90% of initial enzyme activity was maintained after 10 days of incubation in case that the volume of organic phase was equal to that of buffer phase, while the half life of thermolysin was about 2 days in aqueous buffer solution. The results of partitioning of substrates and product in organic two-phase system showed that the difference in partition coefficients between substrates and product was maximum at pH 5.5. The optimal pH for Z-APM synthesis in organic two-phase system was found to be 5.5~5.8, which is consistent with the value expected from the partition experiments. As the concentration of substrates was increased the conversion yield of Z-APM was increased with concomitant reduction of L-PM·HCl hydrolysis. In case that the concentration of L-PM·HCl and Z-Asp were 160 mM and 80 mM respectively, the conversion yield of Z-APM reached 90% after 28 hrs of reaction. The yield obtained at different volume ratio of organic phase compares well with the predicted equilibrium constant in biphasic system.

효소를 이용한 아스파탐 합성은 N-benzyloxycarbonyl-L-aspartic acid(Z-Asp)와 L-phenylalanine methyl ester(L-PM)를 기질로 단백질 가수분해 효소의 일종인 thermolysin의 촉매에 의해 아스파탐의 전구 물질인 N-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine methyl ester(Z-APM)을 합성한 다음, catalytic hydrogenation에 의해 보호기를 제거하여 아스파탐을 얻게 되는데(1), 화학합성법은 달리 단맛의  $\alpha$ -아스파탐만을 생성하게 되고 공정이 비교적 간단하다는 잇점이 있

다.

일반적으로 단백질 가수분해 효소(protease)를 이용하여 펩타이드를 합성하는 공정은 equilibrium controlled synthesis 방법과 kinetically controlled synthesis 방법으로 나눌 수 있는데(2), 수용액에서 생성물을 침전물 형태로 얻는 방법이나 유기용매 이상계를 이용하여 반응평형을 생성물쪽으로 이동시키는 방법 등은 모두 equilibrium controlled synthesis에 해당하며, 아미노산이나 펩타이드 유도체를 사용 nucleophile과 반응시켜 비가역적으로 생성물을 합성하는 방법은 kinetically controlled synthesis에 해당된다.

가수분해 효소를 이용하여 equilibrium controlled

**Key words:** Aspartame precursor, enzymatic process, organic two-phase reaction

\*Corresponding author

synthesis에 의해 펩타이드를 합성하는 데에는 앞에서 이야기한 바와 같이 수용액에서 반응을 시켜 산물을 침전물 형태로 얻는 방법과 유기용매 이상계를 이용하는 방법이 있다. Z-APM 합성 반응의 경우 수용액에서 반응시키게 되면 생성되는 Z-APM과 기질인 L-PM이 부가화합물 형태로 침전되기 때문에 Z-APM을 얻기 위해 L-PM을 분리해내는 공정이 추가로 필요한 뿐더러 L-PM이 2배로 소모되어 비경제적이다(3). 반면에 유기용매 이상계에서는 수용액상에서 생성된 산물이 계속적으로 유기용매상으로 분배되기 때문에 반응산물이 다시 가수분해되는 것을 방지할 수 있고, 또한 생성물이나 반응기질에 의한 저해현상이 나타나는 경우에도 이를 감소시킬 수 있어 결과적으로 합성수율을 높일 수 있으며, 생성물의 회수공정이 간단하여 분리정제가 용이하게 된다(4-6).

이상에서 살펴볼 때 유기용매 이상계에서의 thermolysin을 사용한 아스파탐 전구체(Z-APM)의 효소 합성반응이 기존화학합성에 비해 여러가지로 유리함을 예측할 수 있으며 이로 인해 효소를 이용한 아스파탐 전구체 합성에 대해 많은 연구가 진행되어 오고 있다(7-12). 본 연구에서는 thermolysin을 사용하여 유기용매 이상계에서의 아스파탐 전구체 합성시 효소합성반응의 주요한 변수인 효소농도, 기질농도 및 몰비(mole ratio), pH 그리고 온도 등이 반응기질의 분해반응, 효소의 안정성, 그리고 Z-APM 합성에 미치는 영향을 조사함으로써 유기용매 이상계에서의 효소반응에 대한 최적화를 도모하였다. 한편 이외에도 유기용매 이상계에서는 기존 수용액에서의 효소반응과는 달리 수용액층에 대한 유기용매 층의 부피비가 변함에 따라 기질 및 산물의 분배에 따른 겉보기 반응평형 상수가 이동한다고 알려져 있어(13, 14) 이에 대한 연구도 아울러 병행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Z-APM 합성에 사용한 효소는 thermolysin(E.C. 3.4.24.4)으로서 Sigma로부터 구입하여 사용하였고 효소 활성을 측정하기 위해서 사용된 synthetic peptide인 FAGLA(3-(2-furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide), 그리고 반응기질인 Z-aspartic acid와 L-phenylalanine methyl ester hydrochloride도 Sigma로부터 구입하

였다. L-Phenylalanine은 Pierce에서 구입하여 사용하였고 유기용매로 사용된 ethylacetate(EtOAc)는 LC grade의 Aldrich 제품을 사용하였다. 그리고 HPLC mobile phase로 사용된 water와 acetonitrile은 HPLC grade로 Baxter에서 구입하여 사용하였다.

### 기질 및 반응산물의 분석

반응기질 및 산물은 reverse phase column( $\mu$ -Bondapak C18, 30 cm $\times$ 3.9 mm)을 사용한 HPLC(Hitachi L-3000)를 이용하여 220 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이때 유속은 0.8 ml/min으로 하여 정량분석하였다. 이동상으로 acetonitrile과 물의 비율을 60:40(v/v)로 섞은 다음 phosphoric acid를 가하여 pH를 2.5로 보정하여 사용하였다.

### 효소의 활성도 측정

효소의 활성도는 synthetic peptide인 FAGLA(3-(2-furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide)를 기질로 사용하여 가수분해된 정도를 spectrophotometer로 측정하였다(14).  $2.49 \times 10^{-3}$  M FAGLA(in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.22) 3 ml에 효소용액 0.5 ml을 넣고 섞은 후 30초 후 UNIKON 930 spectrophotometer를 이용하여 345 nm에서 time drive mode로서 5분 동안 가수분해된 정도를 측정하였다. 이때 O.D.의 감소된 정도 즉,  $\Delta A_{345}/\text{min}$ 값을 효소의 활성 unit로 사용하였는데 가용성 thermolysin의 FAGLA 분해 활성은 2.09 unit/mg protein 이었다.

### 기질의 가수분해 측정

Z-APM 합성을 위한 기질의 하나인 L-PM·HCl의 수용액에서의 자연분해를 조사하기 위하여 70 mM L-PM·HCl을 0.25 M Tris-HCl buffer에 녹인 다음 40°C에서 pH 6~9 범위내에서 시간에 따른 분해속도상수를 측정하였다. 한편 유기용매 이상계에서의 기질 분해반응을 조사하기 위해 MES buffer층에 대한 유기용매층의 부피비( $\alpha$ )를 각각 1, 4, 9 그리고 EtOAc로 포화시킨 MES 완충용액, MES 완충용액으로 포화시킨 EtOAc를 사용하여 초기 L-PM·HCl 농도를 40 mM, pH는 5.80 그리고 온도 40°C에서 교반을 하면서 분해속도상수를 측정하였다.

### 효소의 안정성 측정

Saturated MES buffer(pH 6.2)와 MES buffer/ethylacetate two phase system에서의 thermolysin의 stability를 조사하기 위하여 효소의 농도를 total volume 기준으로 일정량 부가하여 시간에 따른 thermolysin의 잔여 활성도를 조사하였다. 유기용매 이상계인 경우에는  $\alpha$ 값을 0, 1, 4, 9 그리고 온도를 30, 40, 50°C로 변화시켜 가면서 효소의 활성도를 측정하였다.

**기질 및 반응산물의 분배계수 측정**

유기용매 이상계에서의 기질과 생성물의 pH에 따른 분배를 조사하기 위하여 universal buffer(pH 2~10)에 ethyl acetate를 부피비가 1:1되게 첨가하여 40°C에서 2시간 saturation시킨 후 각각 Z-Asp, L-PM·HCl 그리고 Z-APM을 녹여 다시 40°C에서 2시간 교반한 다음 각각 유기용매상과 수용액상에서의 농도를 HPLC로 측정하였다. 여기에서 분배계수는 수용액층에서의 농도에 대한 유기용매층에서의 농도비( $P_i = C_{i.org}/C_{i.buffer}$ )로 나타내었다.

**유기용매 이상계에서의 Z-APM 합성**

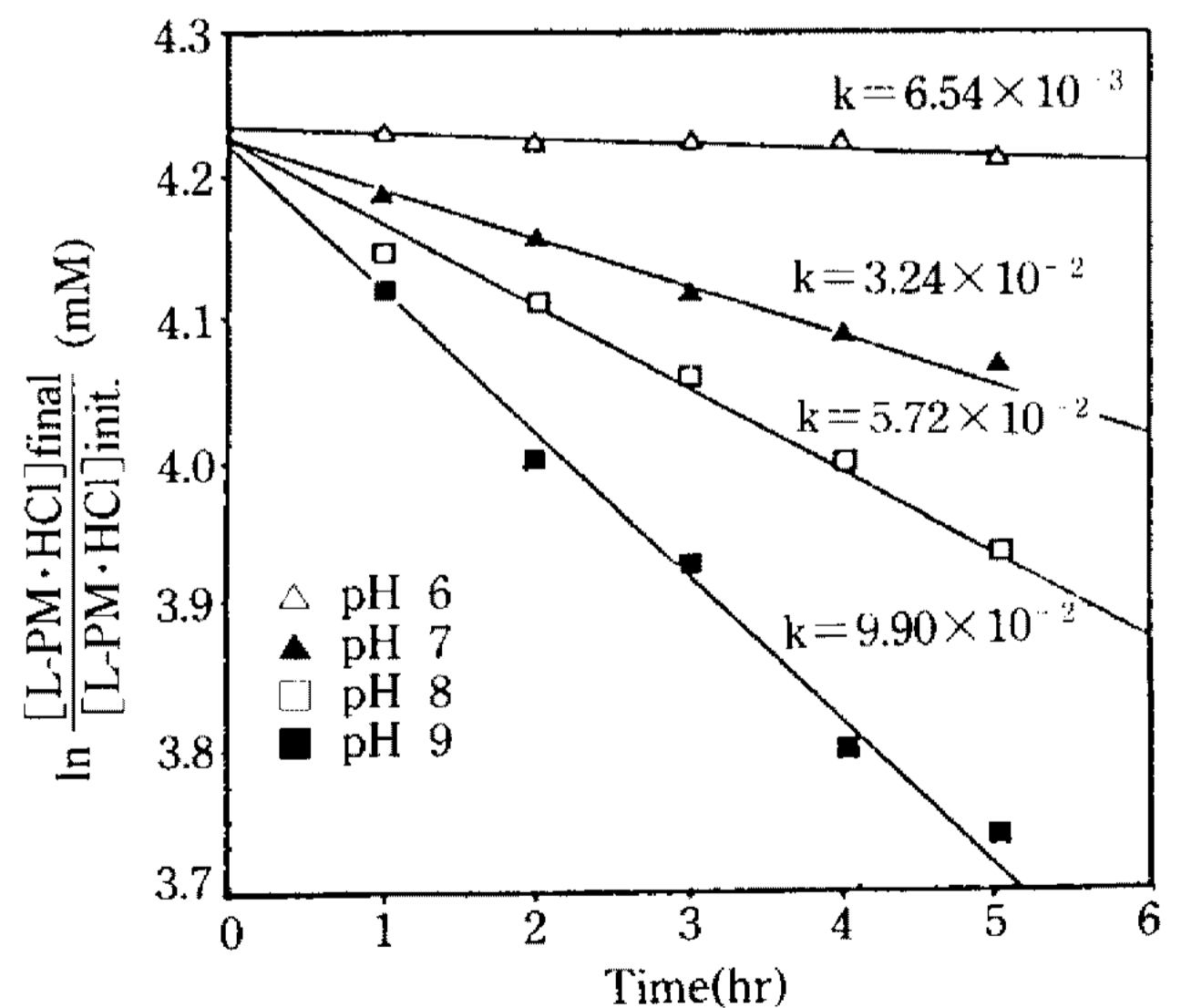
pH의 영향을 관찰하기 위하여 Z-Asp와 L-PM·HCl을 각각 10 mM 되게끔 MES buffer에 녹인 후 pH를 3~8범위로 보정한 다음  $\alpha=1$ 이 되게끔 saturated EtOAc를 첨가하고 효소를 2.0 mg/ml을 부가하여 40°C에서 20시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 각 상에서 적당한 양을 취하여 HPLC로 분석하였다. 기질의 농도가 Z-APM 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Z-Asp와 L-PM·HCl의 농도를 각각 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mM이 되도록 MES buffer에 녹인 다음 pH를 5.5로 보정하였다. 보정 후  $\alpha=1$ 이 되도록 saturated EtOAc를 부가한 다음 효소를 2.0 mg/ml 되게 가하여 40°C에서 20시간 반응시켰다. 기질의 몰비에 대한 영향을 관찰하기 위해서 Z-Asp 농도를 80 mM로 고정하고 L-PM·HCl의 농도를 각각 40, 80, 160, 240 mM로 하여 위와 같은 조건으로 반응시켰다. Z-APM 합성에 미치는  $\alpha$ 의 영향을 관찰하기 위하여  $\alpha$ 를 각각 0, 0.25, 1.0, 1.5, 4, 9로 섞은 다음 기질농도가 각각 80 mM이 되도록 Z-Asp와 L-PM·HCl을 녹인 다음 pH를 5.5로 보정하고 효소 2 mg/ml 부가하여 40°C에서 20시간 반응시켰다.

**결과 및 고찰**

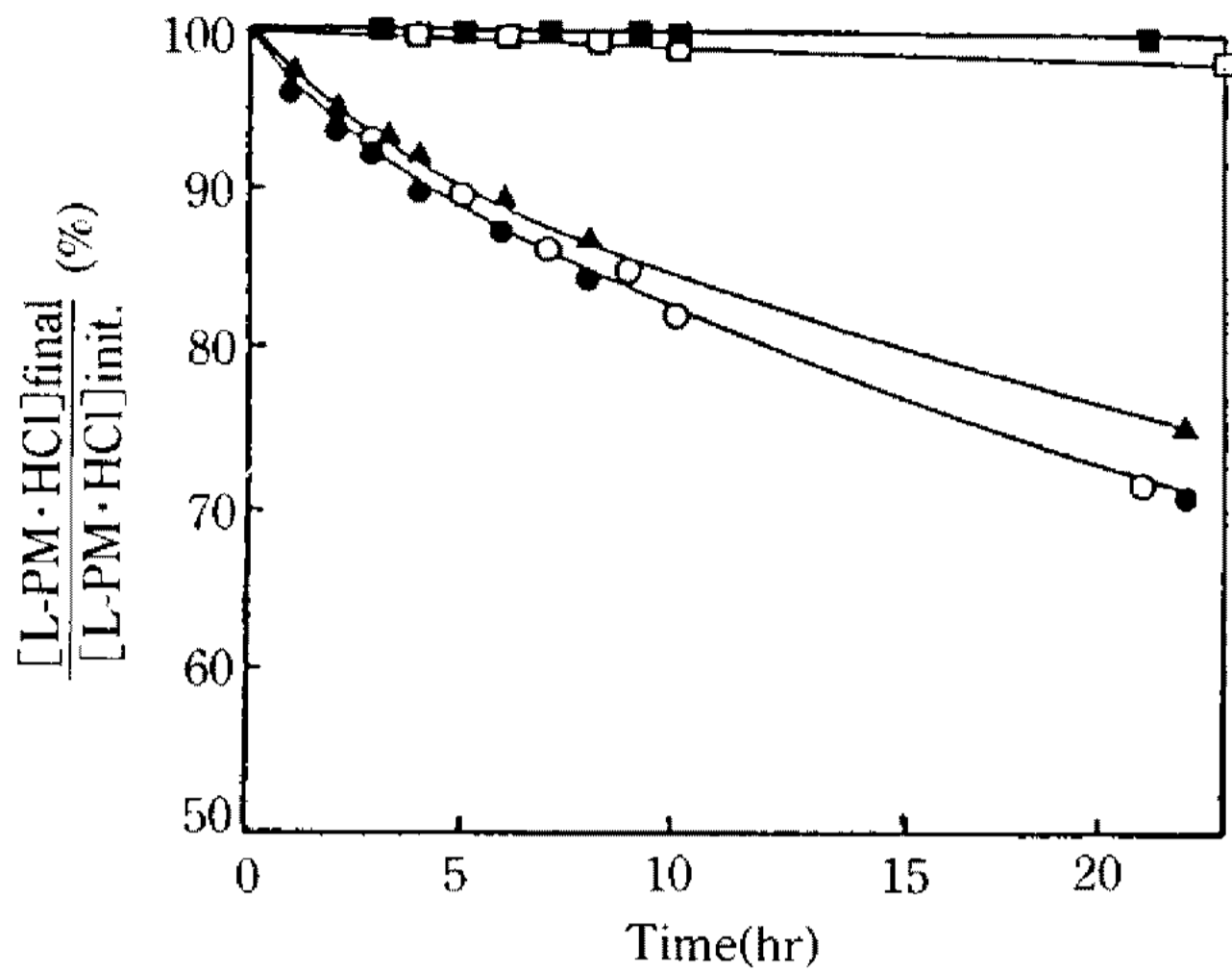
**기질의 자연분해**

Z-APM 합성에는 Z-Asp와 L-PM·HCl의 두 기질이 사용되는데 합성되는 Z-APM의 양을 기준으로 기질과 생성물의 몰 비율을 조사한 결과 소비되는 Z-Asp의 양은 1:1의 비율로 이론적 반응 stoichiometry와 같지만 L-PM·HCl의 경우는 생성되는 Z-APM의 양보다 많은 양이 소모되었다(3). 이는 일부 L-PM·HCl이 자연분해에 의해 더 소비되는 것으로 판단되었다. 기질인 L-PM·HCl이 수용액에서 가수분해되는 경우 L-phenylalanine과 methanol로 분해될 수 있는데, 이러한 L-PM·HCl의 자연분해가 반응조건에 따라 어떻게 달라지는가에 대해 살펴보았다.

수용액계에서의 pH에 따른 L-PM·HCl의 자연분해 정도를 측정한 결과 pH에 따라 크게 차이를 나타내었는데 pH 6~9 범위내에서는 pH가 높아질수록 분해가 잘 일어났으며 Z-APM 합성 반응조건인 pH 6 부근에서는 분해속도상수(k)가  $6.54 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$  정도로 비교적 작은 것으로 나타났다(Fig. 1). 한편 유기용매 이상계의 L-PM·HCl의 자연분해 정도를 살펴보았는데 수용액층에 대한 EtOAc 층의 부피비( $\alpha$ )를 바꾸어가면서 관찰하였는 바 유기용매 이상계에서는 buffer system에 비해 자연분해가 훨씬 느리게 일어났다(Fig. 2). EtOAc로 단지 saturation시킨 buffer



**Fig. 1. Effect of pH on L-PM·HCl degradation.** (70 mM L-PM·HCl in 0.25 M Tris-HCl buffer; Temperature, 40°C)

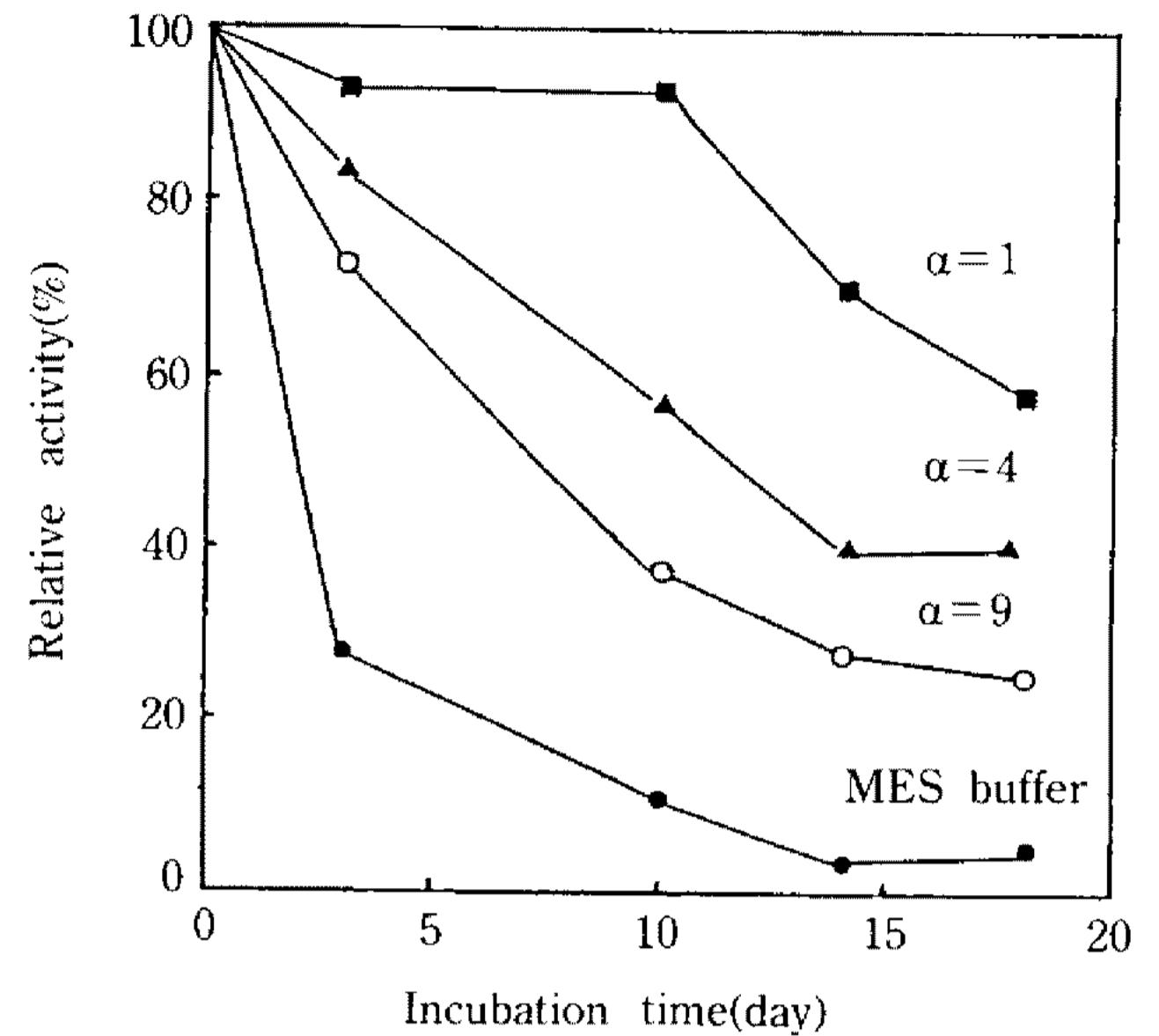


**Fig. 2. Effect of  $\alpha$  on L-PM·HCl degradation.** (L-PM·HCl, 40 mM; Temperature, 40°C; pH, 5.8) ( $\blacktriangle$ )  $\alpha=0$ ; ( $\square$ )  $\alpha=1$ , ( $\blacksquare$ )  $\alpha=\infty$ ; ( $\circ$ ) MES buffer; ( $\bullet$ ) MES buffer containing 1 mg/ml of enzyme solution.

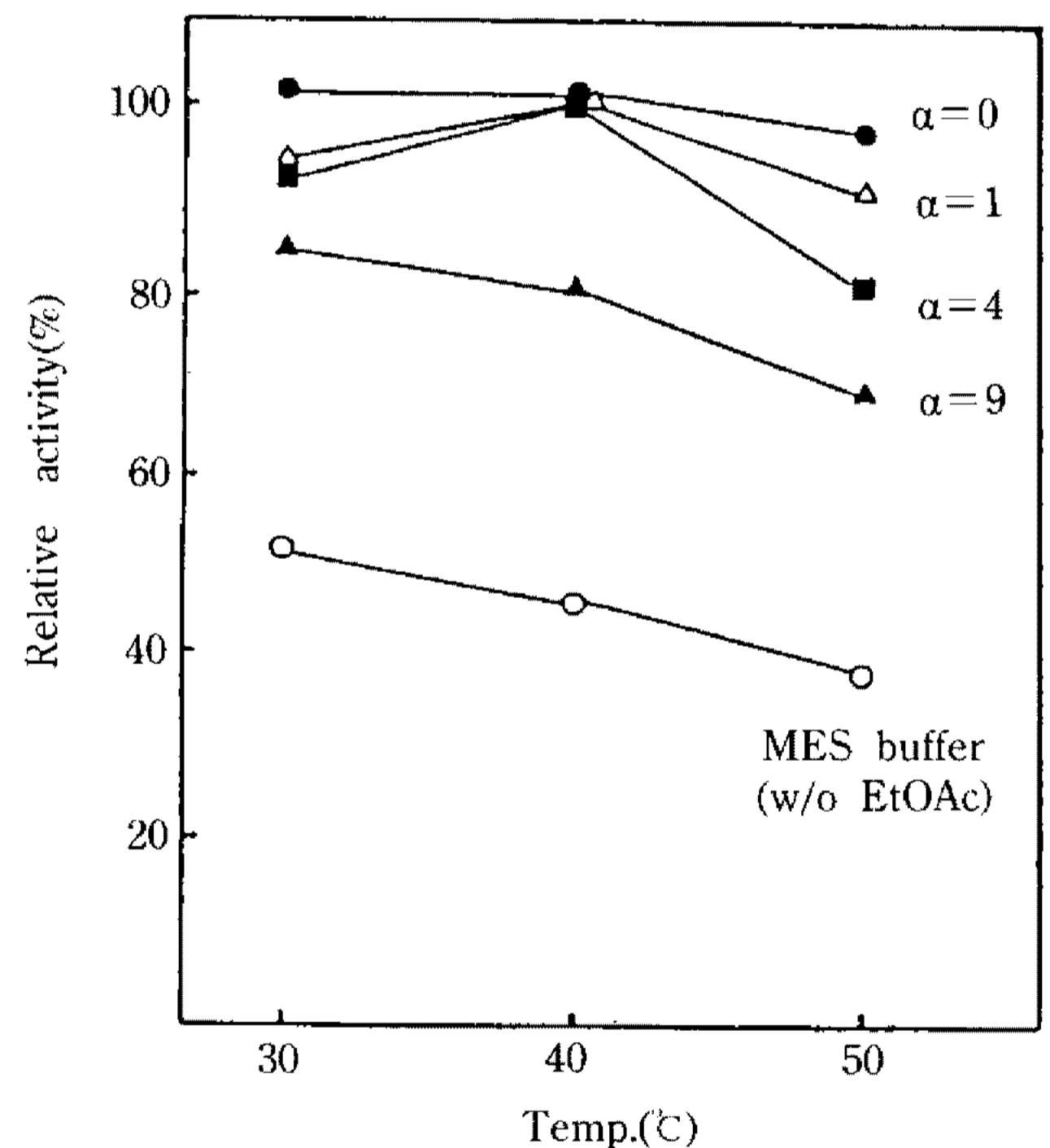
system( $\alpha=0$ )에서도 자연분해속도는 다소 낮아졌으며 saturated EtOAc system( $\alpha=\infty$ )에서는 20시간 반응 후에도 거의 분해가 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 이로써 유기용매 존재하에서는 L-PM HCl의 자연분해가 크게 억제됨을 알 수 있다. 한편, 효소용액 (1 mg/ml)을 부가한 buffer system에서도 효소가 없는 buffer에서와 마찬가지로 거의 같은 자연분해 속도를 나타내고 있는 것으로 볼때 L-PM·HCl 자연분해에 대한 효소의 영향은 없는 것으로 나타났다(Fig. 2).

**효소의 안정성**

Thermolysin은 열에 안정한 metalloprotease로서 calcium ion이 thermolysin의 구조를 안정화시키는 것으로 알려져 있다(15). 그러나 shear와 같은 물리적인 충격이나 유기용매를 사용하는 반응조건에서의 안정성 여부가 문제점으로 남아 있는 상태이어서 유기용매 이상제하에서 교반을 하면서 thermolysin의 안정성을 살펴보았다. Fig. 3에 도시하였듯이 EtOAc를 포함하지 않은 MES buffer(pH 6.2)에서는 40°C에서 thermolysin 활성의 반감기(half life)가 약 2일 정도로 효소활성이 많이 줄어들었는데 비하여, 유기용매 이상제하에서는 비교적 오랜시간 stability를 높게 유지하고 있으며 특히  $\alpha$ 가 1인 경우에는 10일 후에도 90% 이상의 높은 stability를 나타내었다. 유기용매 이상제하에서 효소활성이 수용액에서 보다 더 높은 것으로

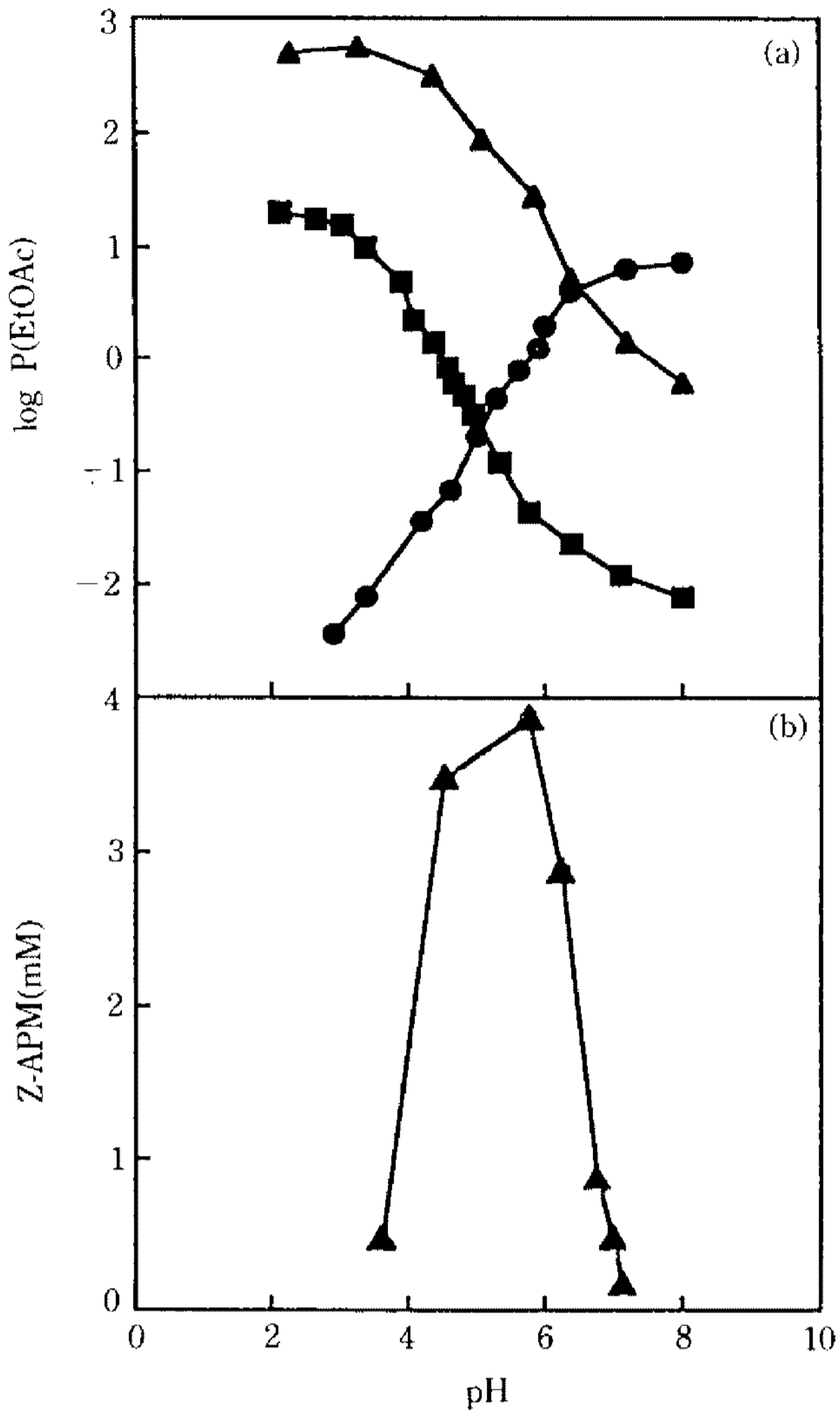


**Fig. 3. Stability of thermolysin in organic two-phase system.** (Temperature, 40°C; pH, 6.2; Enzyme conc., 0.5 mg/ml)



**Fig. 4. Effect of temperature and  $\alpha$  on enzyme stability.** (Enzyme conc., 1.0 mg/ml; pH, 6.2; Incubation time, 1 day)

나타나 이를 좀더 확인하기 위하여 incubation time을 24시간으로 하고 온도와  $\alpha$ 를 변화시켰을 때의 효소 활성을 측정하였다. 실험결과를 Fig. 4에 나타내었는데 이 경우에도 온도에 관계없이 buffer에서 보다 유기용매 이상제를 이용했을 때 여전히 높은 stability를 유지하였다. 특히  $\alpha=0$ , 즉 EtOAc로 saturation시킨 buffer에서 가장 stability가 높게 유지되고 있음은



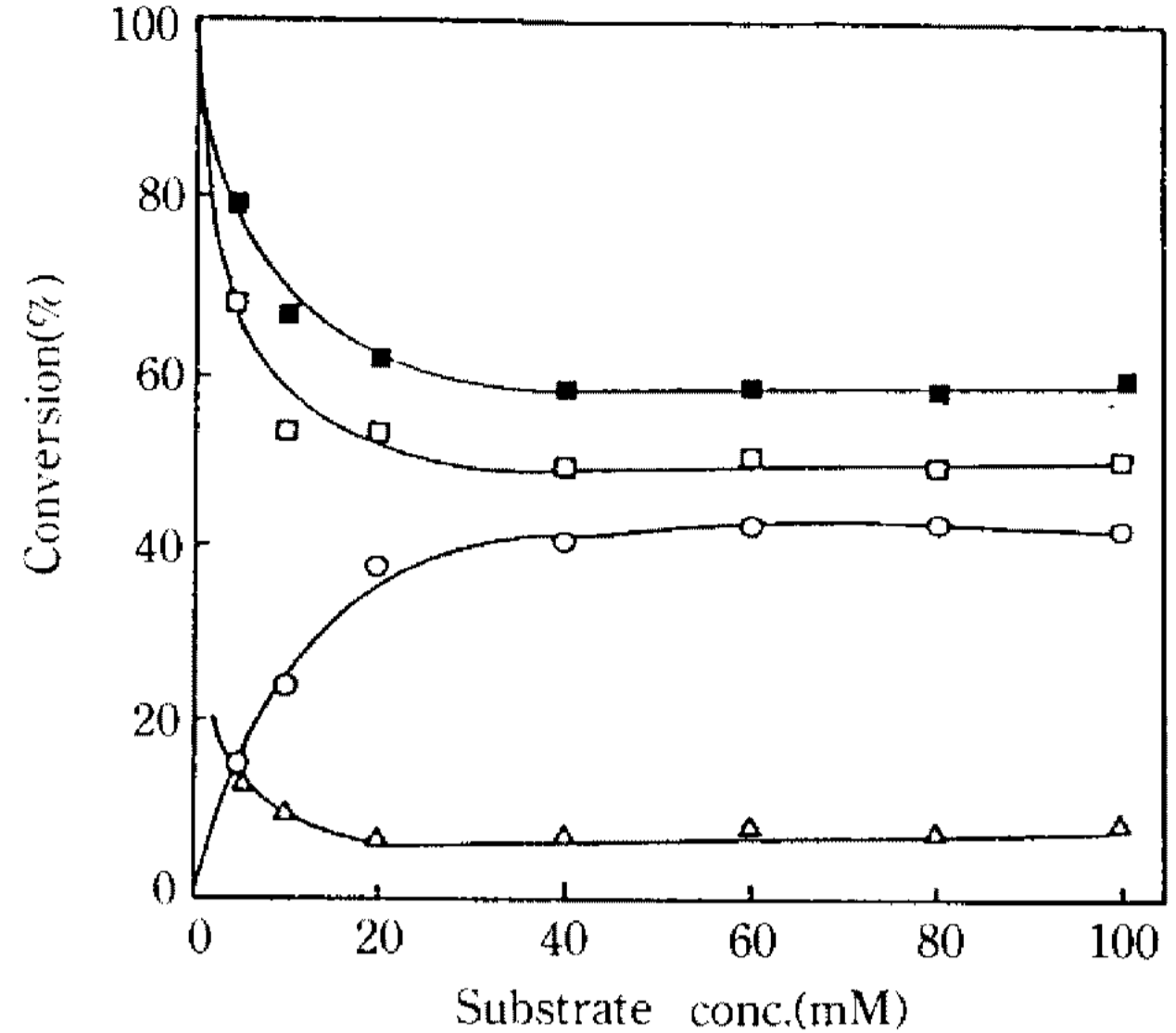
**Fig. 5. Effect of pH on the partition coefficient(a) and Z-APM synthesis(b) in organic two-phase system( $\alpha=1$ ). Enzyme reactions were carried out at 40°C for 20 hrs.**

(■), Z-Asp; (●), L-PM·HCl; (▲), Z-APM

매우 주목할만한 사실로 아직 그 이유는 밝혀내지 못하였으나 다른 효소의 경우도 이러한 현상을 나타내는지 연구중에 있다.

**유기용매 이상계에서의 기질 및 산물의 분배**

Z-APM 합성에 있어서 반응평형의 전이에 영향을 미치는 기질 및 산물의 분배를 알아보기 위하여 유기용매 이상계에서 pH를 변화시키면서 분배계수를 측정하였다. Fig. 5a의 결과에서 보는 바와 같이 carboxylic group을 갖는 Z-Asp 및 Z-APM은 pH 증가에 따라 분배계수가 감소하지만 amine group을 갖는 L-PM·HCl은 반대의 경향을 나타내었다. 이러한 pH에 따른 분배계수의 변화는 Rekker의 방법 및 Linear



**Fig. 6. Effect of substrate concentration on Z-APM synthesis.**

(Enzyme conc., 2 mg/ml; Temperature, 40°C; pH, 5.5; Reaction time, 22 hrs;  $\alpha=1$ ; L-PM·HCl: Z-Asp=1 : 1) (○), Z-APM; (□), L-PM·HCl; (△), L-Phe; (■), Z-Asp

Free Energy Relationship을 사용한 예측결과와 잘 일치하는 것으로 이에 대해서는 이미 발표한 바 있다 (16). 한편 pH 5.5에서 두 기질의 분배계수가 Z-Asp는 0.03, L-PM·HCl은 0.95 정도로 비교적 aqueous phase에 주로 존재하거나 절반가량 존재하는데 반해서 산물인 Z-APM은 분배계수가 38.0으로서 유기용매층에 분배되는 점으로 미루어(Fig. 5a), 기질과 생성물의 분배계수 차이가 가장 큰 pH 5.5 부근이 최적 pH일 것으로 예상되었다. 한편 Z-APM 합성반응에 있어서의 최적 pH를 찾아내기 위해  $\alpha=1$ , pH 3~8 범위에서 유기용매 이상계를 이용하여 Z-APM을 합성하였는데 pH 5.5~5.8에서 가장 수율이 높았던 바 (Fig. 5b), 이 결과는 앞에서 기질 및 산물의 분배계수 측정실험으로부터 예측했던 최적 pH 범위와 일치하고 있음을 알 수 있었다.

**기질농도에 의한 영향**

유기용매 이상계에서의 초기 기질농도에 의한 효과를 고찰하기 위해 두 기질의 농도비가 1 : 1,  $\alpha=1$ , pH 5.5에서 22시간 동안 Z-APM 합성반응을 수행하였다. 대체로 20 mM까지 초기 기질농도가 높을수록 Z-APM의 수율(conversion yield)이 증가함을 알 수 있었으며, 앞에서 언급한 바와 같이 기질인 L-PM·HCl의 일부가 L-phenylalanine으로 자연분해되어 Z-Asp에 비해 L-PM·HCl의 소비가 많은 것으로 나



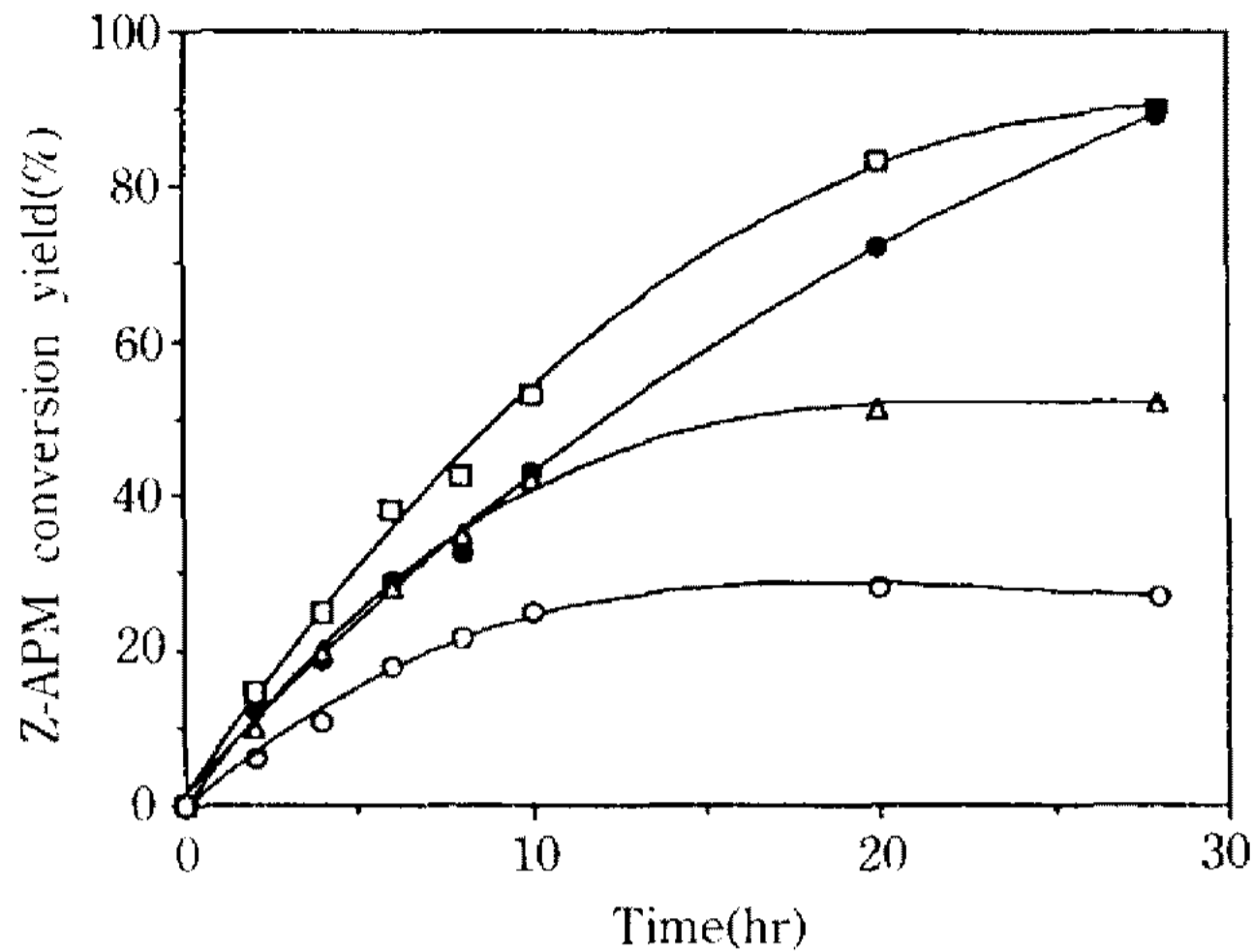


Fig. 7: Effect of substrate ratio on Z-APM synthesis.

(Enzyme conc., 2 mg/ml; Temperature, 40°C; pH, 5.5;  $\alpha=1$ )

(○), L-PM·HCl: Z-Asp=40 mM: 80 mM, (△), L-PM·HCl: Z-Asp=80 mM: 80 mM, (□), L-PM·HCl: Z-Asp=160 mM: 80 mM, (●), L-PM·HCl: Z-Asp=240 mM: 80 mM

타났다(Fig. 6). 한편 Z-APM 합성에 있어서의 두 기질인 L-PM·HCl과 Z-Asp의 몰비에 의한 영향을 살펴보기 위해 Z-Asp의 농도를 80 mM로 고정하고 L-PM·HCl의 농도를 각각 40, 80, 160, 240 mM로 해서  $\alpha=1$ 인 유기용매 이상계를 이용하여 실험하였다. Fig. 7에 도시하였듯이 L-PM·HCl 농도가 증가할수록 conversion yield가 증가하는 경향을 나타냈으나 L-PM·HCl의 농도가 240 mM인 경우 반응속도는 160 mM인 경우보다 낮았다. Z-Asp 농도가 80 mM, L-PM·HCl의 농도가 160 mM인 경우에 약 90%의 수율을 나타냈을 뿐 아니라 초기반응 속도도 비교적 높게 나타나 두 기질의 몰비율이 1:2인 경우가 가장 적합한 것으로 나타났다.

#### 유기용매 부피비에 의한 영향

유기용매 이상계에서는 유기용매 층의 부피에 대한 수용액 층의 부피, 즉  $\alpha$ 값이 반응평형에 큰 영향을 미치고 있다고 알려져 있다(7). 이는 앞에서 살펴보았듯이 수용액상에서 효소반응에 의하여 생성된 산물이 유기용매상으로 분배되며 기질도 수용액상과 유기용매 상에 적절히 분배되는데 기인하는 것으로서, 수용액상에서의 반응평형 상수값과 유기용매 이상계에서의 평형 상수값은 달라지게 된다. 한편 두 기질로 두 개의 산물이 생성되는 경우 Martinek 등(13)

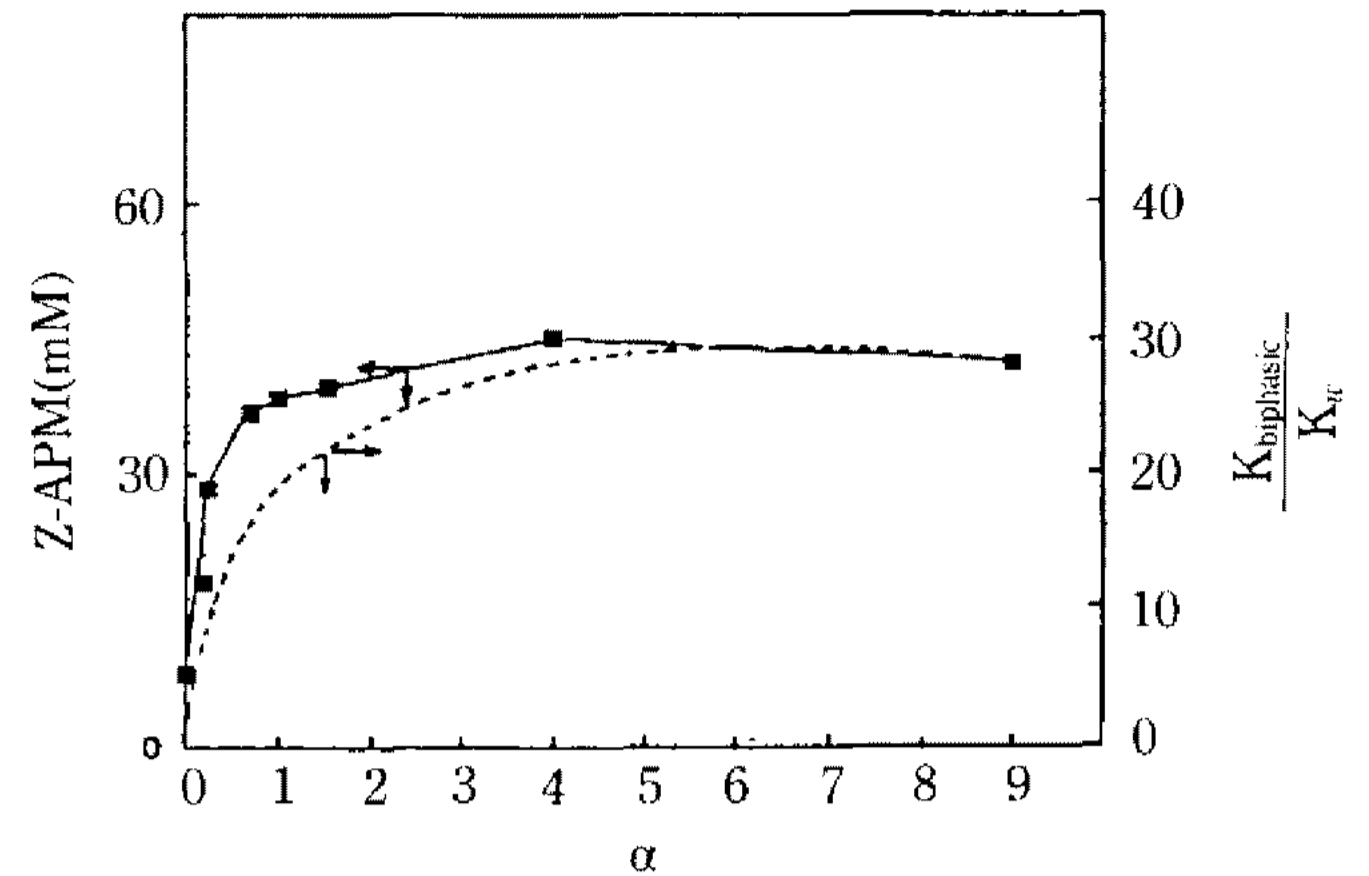


Fig. 8. Effect of  $\alpha$  on Z-APM synthesis.

(Substrate conc., 80 mM Enzyme conc., 2 mg/ml; pH, 5.5; Temperature, 40°C; Reaction time, 22 hrs) Dashed line: Calculated value of  $K_{biphasic}/K_w$

이 제안한 유기용매 이상계에서의 반응평형 상수값 ( $K_{biphasic}$ )을 Z-APM의 경우에 적용하면 다음과 같다.

$$K_{biphasic} = K_w \frac{(1 + \alpha \cdot P_{Z-APM})(1 + \alpha \cdot P_{H_2O})}{(1 + \alpha \cdot P_{Z-Asp})(1 + \alpha \cdot P_{L-PM})}$$

여기서  $K_w$ 는 수용액에서의 평형상수,  $\alpha$ 와  $P$ 는 각각 유기용매의 부피비 및 분배계수를 나타낸다. 앞서의 실험으로부터 pH 5.5일때 기질 및 산물의 분배계수는 각각  $P_{Z-Asp}=0.03$ ,  $P_{L-PM \cdot HCl}=0.95$ ,  $P_{Z-APM}=38.0$  그리고  $P_{H_2O}=0.0012(17)$ 이므로  $\alpha$ 값의 변화에 따른  $K_{biphasic}/K_w$  값을 계산할 수 있는데 반응기질의 농도가 80 mM인 경우 Z-APM 합성수율에 대한 실험결과와 비교할 때 전반적인 경향이 같음을 알 수 있다(Fig. 8). 이로부터 유기용매 부피비의 변화에 따른 Z-APM 수율의 증가는 반응기질 및 생성물의 분배정도 차이에 기인한 평형상수의 변화에 의한 것이며 유기용매 이상계를 이용하여 Z-APM 합성반응의 평형상수를 30배까지 증대시킬 수 있음을 알 수 있다.

#### 요 약

유기용매 이상계에서의 thermolysin을 사용하여 아스파탐 전구체 합성시 pH, 온도, 기질농도, 그리고 유기용매상에 대한 수용액상의 부피비( $\alpha$ ) 등의 변화에 따른 기질의 분해 반응, 효소의 안정성, 그리고 Z-APM 합성에 미치는 복합적인 영향을 조사함으로써 반응조건을 최적화를 도모하였다. 유기용매 이상계에서의 L-PM·HCl의 자연분해는 수용액에서보다 훨씬

느리게 일어나며, 또한  $\alpha$ 가 증가할수록 분해속도가 감소하는 것을 알 수 있었다. 효소의 안정성은 유기용매 이상계를 이용하였을 때 buffer에서 보다 월등하게 좋았으며 특히  $\alpha=1$ 인 경우 10일 후에도 90% 이상 높은 안정성을 나타내었다.  $\alpha=1$ 인 유기용매 이상계에서 Z-APM의 합성은 pH 5.5~5.8에서 가장 수율이 높았는데, 이는 이상계에서 기질 및 산물의 분배계수로부터 예측했던 최적 pH 범위와 잘 일치하고 있음을 알 수 있다. 대체로 초기 기질농도가 높을수록 전환율이 증가하였으며 L-PM·HCl과 Z-Asp의 몰비가 2:1인 경우에 28시간 반응 후 90% 정도의 수율을 나타냈다. 유기용매 부피비 변화에 따른 유기용매 이상계에서의 Z-APM 합성수율은 이론적으로 예측된 평형상수의 변화결과와 잘 부합함을 알 수 있었다.

### 참고문헌

1. Isowa, Y., M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, H. Satoh, and S. Nishimura. 1979. The thermolysin-catalyzed condensation reactions of N-substituted aspartic and glutamic acids with phenylalanine alkyl esters. *Tetrahedron Lett.* **20**: 2611-2612.
2. Kasche, V. 1986. Mechanism and yield in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme Microb. Technol.* **8**: 4-16.
3. Isowa, Y., M. Ohmori, K. Mori, T. Ichikawa, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, H. Satoh, and S. Nishimura. 1979. Addition compound of dipeptide derivative and amino acid derivative. US Patent 4,165,311.
4. Morihara, K. 1987. Using proteases in peptide synthesis. *Trends in Biotechnol.* **5**: 164-171.
5. Antonini, E., G. Carrea and P. Cremonesi. 1981. Enzyme catalyzed reactions in water-organic solvent two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 291-296.
6. Kuhl, P., A. Konnecke, G. Doring, H. Daumer and H.D. Jakubke. 1980. Enzyme-catalyzed peptide synthesis in biphasic aqueous-organic systems. *Tetrahedron Lett.* **21**: 893-896.
7. Oyama, K., S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara, and T. Hashimoto. 1981. Synthesis of aspartame precursor by immobilized thermolysin in an organic solvent. *J. Org. Chem.* **46**: 5241-5242.
8. Nakanishi, K., T. Kamikubo, and R. Matsuno. 1985. Continuous synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester with immobilized thermolysin in an organic solvent. *Biotechnology* **3**: 459-464.
9. Nakanishi, K. and R. Masuno. 1986. Kinetics of enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanine methyl ester. *Eur. J. Biochem.* **161**: 533-540.
10. Nakanishi, K., Y. Kimura, and R. Matsuno. 1986. Kinetics and equilibrium for enzymatic synthesis of peptides in aqueous/organic biphasic systems. Thermolysin-catalyzed synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester. *Eur. J. Biochem.* **161**: 541-549.
11. Durrant, I., R.J. Beynon and P.B. Rodgers. 1986. Effect of glycerol on thermolysin-catalyzed peptide bond synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **25**: 280-285.
12. Yang, C.-P. Su. 1988. Synthesis of aspartame precursor:  $\alpha$ -L-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in ethyl acetate using thermolysin entrapped in polyurethane. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 595-603.
13. Martinek, K., A.N. Semenov and I.V. Berezin. 1981. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift. *Biochim. Biophys. Acta* **658**: 76-89.
14. Martinek, K. and A.N. Semenov. 1981. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. II. Shift of ionic equilibria. *Biochim. Biophys. Acta* **658**: 90-101.
15. Feder, J., L.R. Garrett and B.S. Wildi. 1971. Studies on the role of calcium in thermolysin. *Biochemistry* **10**: 4552-4556.
16. 이선복. 1989. 분배계수의 예측방법과 생물공정에의 응용. *생물화공* **3**(4): 25-34.
17. Leo, A., C. Hansch, and D. Elkins. 1971. Partition coefficient and their uses. *Chem. Rev.* **71**: 525-616.

(Received December 26, 1991)